

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 509—513, September 1969

## Eine quantitative Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Thiamin und Thiaminpyrophosphat in Lebensmitteln und Ausscheidungen

VON LIESEL WILDEMANN

*Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie Dortmund*

(Eingegangen am 30. Mai 1969)

Es wird eine einfache, spezifische und schnelle Methode für die Bestimmung von Thiamin und Thiaminpyrophosphat beschrieben. Eine Hydrolyse der Phosphatgruppen ist nicht erforderlich. Nach Enteiweißung wird die Probe über eine Sephadex-G-25-Säule gegeben und mit dem Thiochromtest bestimmt. Die beste Reproduzierbarkeit wurde im Bereich 0,5—3 µg erzielt. Die Wiederfindungsrate für reine Substanzen betrug 97% (Thiamin) bzw. 99% (Thiaminpyrophosphat).

### *A quantitative method for the simultaneous determination of thiamine and thiamine pyrophosphate in food or excreta*

A simple, specific, and rapid method for the estimation of thiamine and its pyrophosphoric ester is described. Hydrolysis of the phosphate groups is not necessary. After deproteinization, the sample is passed through a column of sephadex G-25 and determined by the thiochrome test. The best reproducibility was obtained in the range 0.5—3 µg. The recovery of pure substances was 97% for thiamine and 99% for cocarboxylase.

Die meisten Thiaminbestimmungen fußen auf der von JANSEN 1936 (1) eingeführten fluorometrischen Messung des Thiochroms, eines Oxydationsproduktes des Thiamins. Diese Messung hat den Vorteil, daß sie einfach ist und wenig Zeitaufwand beansprucht, hat aber den Nachteil, daß sie durch Nebenfluoreszenzen gestört wird. Man hat 2 Wege verfolgt, diese Nebenfluoreszenzen auszuschalten:

1. ihre Beseitigung aus der eigentlichen Analysenprobe,
2. ihre Kompensierung durch eine Vergleichsprobe, in der die Thiochrombildung unterbunden oder die gebildete Thiochromfluoreszenz gelöscht wurde.

Für beide Richtungen lassen sich zahlreiche Autoren anführen (2).

Man hat versucht, das Thiamin durch Ausschütteln in saurer Lösung an Frankonit zu adsorbieren und den mit Thiamin angereicherten Frankonit direkt der Analyse zu unterwerfen (3—5). Auch die Extraktion der störenden Nebenfluoreszenzen aus dem angesäuerten Gemisch mittels Isobutylalkohol vor der Oxydation des Thiamins zu Thiochrom wurde angewandt (6). Am erfolgreichsten war die Entfernung der Nebenfluoreszenzen aus dem Meßwert durch Säulenchromatographie an Permutit, Decalso, Dowex und Amberlite, sowie die Auftrennung der Vitamin B<sub>1</sub>-haltigen Substanzgemische durch die Papierchromatographie (siehe (2) S. 157/58 und (7)).

Von Anfang an wandte man sich auch dem zweiten Weg zu, der Kompensierung der Nebenfluoreszenzen durch eine Vergleichsprobe ohne Thiochrombildung. Diese Vergleichsprobe enthielt nur die Nebenfluoreszenzen, die vom Testwert subtrahiert wurden. Die Unterbindung der Thiochrombildung oder die Auslöschung der Thiochromfluoreszenzen geschah durch Weglassen des Oxydationsmittels, durch Zugabe von Natriumbisulfid

vor der Oxydation, durch Blockierung der an der Thiochrombildung beteiligten Aminogruppen durch Benzolsulfochlorid oder durch pH-Verschiebung nach der Thiochrombildung ins extrem saure Gebiet (8). Allen aufgeführten Abänderungen der ursprünglichen Thiaminbestimmungsmethode von JANSEN ist gemeinsam, daß sie nur das Thiamin messen, weshalb vorher die Cocarboxylase mit Phosphatase zu Thiamin aufgespalten werden muß.

ROTH unternahm im Jahre 1938 (9) den Versuch, das Cocarboxylasethiochrom, das hydrophil ist und deshalb nicht mit Isobutanol, Butanol oder Amylalkohol extrahiert werden kann, in der wäßrigen Phase zu bestimmen. Diese Methode ist vermutlich noch anfälliger gegen Störfluoreszenzen als die Thiaminbestimmung. Sie wurde 1950 von WESTENBRINK und STEYN-PARVÉ (10) als eine mögliche Methode zur Bestimmung des Thiaminpyrophosphats erwähnt und 1956 von OSTROVSKIJ (11), nach hohen Gaben von Thiamin an Versuchspersonen in kleinen Blutmengen angewandt. Als unterste Grenze der Bestimmbarkeit gibt er 1 mg Cocarboxylase pro 1 ml Blut an. Wegen der Unempfindlichkeit und Unsicherheit dieses Verfahrens haben wir eine neue Methode ausgearbeitet, die eine spezifische Bestimmung von Thiamin und seinem Pyrophosphatester erlaubt. Sie wird im folgenden mitgeteilt.

### Methodik

#### *Prinzip der Methode*

Die hier dargestellte Methode erfaßt Thiamin und Thiaminpyrophosphat nebeneinander. Störfluoreszenzen schaltet man durch Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches an einer Sephadexsäule aus. Die beiden Formen des Vitamins werden oxydiert, nach Extraktion von Thiamin fluorimetrisch gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe einer Eichkurve aus 3 oder 4 Testwerten reiner Substanzen ermittelt.

Tab. 1

Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Säulenpassage durch Vergleich mit der direkten Bestimmung  
Die Werte sind Durchschnittswerte aus je 3—4 Analysen. Sie geben die im Durchlauf gefundenen Mengen in Prozent der direkten Bestimmungen an. Die Streuungsprozente zeigen die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert an.

Thiamin				Thiaminpyrophosphat			
0,5 µg	1,0 µg	1,5 µg	2,0 µg	0,5 µg	1,0 µg	1,5 µg	2,0 µg
98 ± 1,6%	99 ± 1,7%	98 ± 1,3%	99 ± 0,9%	100 ± 1,9%	99 ± 2,6%	98 ± 1,2%	102 ± 0,9%

#### Erforderliche Reagenzien und Lösungen

Sephadex G-25 fine (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt)  
0,1proz. wäbr. NaHSO<sub>4</sub>-Lösung  
fluoreszenzfreier Amylalkohol  
15proz. NaOH  
2proz. K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-Lösung  
Oxydationsgemisch: 20 ml 15proz. NaOH + 3 ml 2proz. Kaliumhexacyanoferrat-Lösung.  
Thiamin-Hydrochlorid, Cocarboxylase-Chlorid (Merck AG, Darmstadt)

#### Apparate und Glasgeräte

Photometer mit Einrichtung zur Fluoreszenzmessung  
Primärfilter Hg 313—366 nm  
Sekundärfilter 400—3000 nm  
Fluoreszenzstandard 4709 } Zubehör zum Eppendorffphotometer  
Chromatographierohre von etwa 60 cm Länge und 10—11 mm Durchmesser (Büretten, Brand Wertheim, Qualität Goldbrand)  
Schüttelzylinder mit Graduierung (Brand Wertheim, Qualität Goldbrand)  
Glasküvetten 1 cm Schichtdicke

#### Beschreibung der Methode

Zur Auftrennung der Stoffgemische benutzen wir Sephadex G-25. 10 g trockenes Gel werden zum Quellen in soviel dest. Wasser suspendiert, daß nach der Sedimentation das überstehende Wasser um etwa 50% höher im Glas steht als das gequollene Gel. Nach 3 Std. ist die Quellung vollständig und das Gel kann benutzt werden. Wir füllen es in ein Chromatographierohr von etwa 10—11 mm Durchmesser und 60 cm Länge. Die so hergestellte Sephadexsäule kann mehrere Monate ohne Regeneration benutzt werden. Der zu untersuchende Extrakt wird mit 5 oder 10proz. Trichloressigsäure enteiweißt und bei geringem Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt im Vakuum-Rotationsverdampfer etwas eingeeengt. Dann geben wir 0,2 ml der Probe, in denen 0,5—3 µg Thiamin bzw. Thiaminpyrophosphat enthalten sein sollen, auf die Sephadexsäule. Man läßt einziehen und gibt noch 2 mal 0,5 ml Elutionsmittel nach. Die auslaufenden Tropfen werden in einem graduieren Glaszylinder aufgefangen. Als Elutionsmittel dient 0,1proz. Natriumhydrogensulfat. Die Tropfgeschwindigkeit beträgt etwa 6 Tropfen/Min. Bei der angegebenen Menge Sephadex und dem Durchmesser der Säule läßt man 33 ml als Vorlauf auslaufen. Die nächsten 12 ml enthalten die gesamte Menge an Thiamin und Cocarboxylase. Diese 12 ml werden gesondert in einem Meßzylinder aufgefangen und mit 1 ml Oxydationsgemisch versetzt. Man läßt 2 Min. stehen und extrahiert dann das Thiamin durch 2 Min. langes Schütteln mit 13 ml Amylalkohol. Thiaminpyrophosphat (Cocarboxylase) bleibt in der wäbr. Phase. Von beiden Phasen werden 5 ml abgenommen, die amyalkoholische wird zur Klärung mit 0,5 ml 96proz. Äthylalkohol versetzt. Die Fluoreszenz von wäbr. und amyalkohol. Phase wird nacheinander im Eppendorffphotometer mit Fluoreszenzaufsatz gemessen. Wir benutzen das Primärfilter 313—366 und das Sekundärfilter 400—3000 nm. Als Bezugswert dient der Glasstandard 4709, der auf Anforderung von der Firma mitgeliefert wird. Dieser Standard wird in unserem Fall bei Schaltstufe 5 auf 100% Durchlässigkeit eingestellt. Nach Weiterschalten auf Stufe 7 werden dann die zu messenden Analysenwerte an der Durchlässigkeitsskala abgelesen und die entsprechenden Mengen an Thiamin und Cocarboxylase aus einer Eichkurve, deren Neigungswinkel von Tag zu Tag etwas schwankt, ermittelt. Die Eichkurve muß — für Thiamin und Thiaminpyrophosphat gesondert — täglich neu aufgestellt werden.

#### Ergebnisse

Die Prüfung der Methode haben wir mit reinen Substanzen, Rattenleberextrakten, mit Suspensionen von Bäckerhefe, mit einem Extrakt aus *Lactobacillus viridescens*, mit Menschenharn, Apfelsinensaft und Weizenmehl durchgeführt. In einigen Fällen haben wir einen Vergleich mit der papierchromatographischen Bestimmung (7) vorgenommen und Zusätze reiner Substanzen zu Bäckerhefeextrakten und Apfelsinensaft untersucht.

#### Bestimmung von reinen Substanzen nach Durchlauf durch die Sephadexsäulen

Die Bestimmung von Gemischen reinen Thiamins und Thiaminpyrophosphats nach Sephadex-Behandlung wurde mit direkten Analysen derselben Substanzen ohne Säulendurchlauf verglichen (Tab. 1). Die Werte beider Gruppen stimmen nahezu überein.

#### Untersuchungen von Rattenleberhomogenaten

25 ml Homogenat (Potter-Elvehjem-Methode) einer ganzen Rattenleber in dest. Wasser, das mit Essigsäure auf pH 3,5 eingestellt worden war, wurden mit 25 ml 5proz. Trichloressigsäure versetzt, 20 Min. bei 8000 U./Min. zentrifugiert, einmal mit 5proz. Trichloressigsäure nachgewaschen und wieder zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden vorsichtig mit 15proz. NaOH auf pH 3,5 eingestellt, auf etwa 4 ml eingeeengt, auf 5 ml aufgefüllt und 45 Min. bei 12000 U./Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Doppelanalysen an 2 Säulen ergaben die Werte der Tabelle 2.

Tab. 2

Thiamin- und Thiaminpyrophosphatgehalt von Rattenleber. Doppelwerte der Analysen von 2 verschiedenen Säulen I u. II.

Präparat Nr.	Präparation am	Analyse am	Thiamin (µg/Leber)		Thiaminpyrophosphat (µg/Leber)	
			I	II	I	II
1	17. 9. 68	19. 9. 68	6,94	7,20	85,8	89,9
2	17. 9. 68	20. 9. 68	3,85	3,85	102,5	102,8
3	23. 9. 68	25. 9. 68	7,10	7,32	103,3	104,4

#### Untersuchung von Bäckerhefe

7,5 g Bäckerhefe wurden in wenig auf pH 3,5 angesäuertem Wasser mit Seesand gemörsert und mit 30 ml 5proz. Trichloressigsäure enteiweißt. Nach 15 Min. Stehen wurde 15 Min. bei 4000 U./Min. zentrifugiert, der Rückstand einmal mit 5proz. Trichloressigsäure nachgewaschen und die vereinigten Überstände auf etwa 2,5 ml eingeeengt, nachdem vorher mit 15proz. NaOH

auf pH 3,5 eingestellt worden war. Die 2,5 ml wurden übergspült und auf 5 ml mit dest. Wasser, das mit Essigsäure auf pH 3,5 gebracht worden war, aufgefüllt. Danach wurde etwa 40 Min. bei 12000 U./Min. zentrifugiert und der Überstand im Kühlschrank aufbewahrt. Die Ergebnisse der Analysen zeigt Tabelle 3.

#### Untersuchung von *Lactobacillus viridescens*

Verwendet wurde eine Kultur von *Lactobacillus viridescens*, die 12 Std. ohne Substrat und anschließend 5 Min. in einer Nährlösung mit Zusatz von 100 µg Thiaminchloridhydrochlorid gehalten worden war. Nach Verreiben mit Quarzsand und Aufnahme in Trispuffer von pH 6,5 wurde mit hoher Tourenzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde auf kleine Fläschchen verteilt und bei -20° in der Kühltruhe aufbewahrt. Aus jeder Probe wurden Doppelanalysen von je 0,2 ml auf je 2 Säulen gemacht. Das Ergebnis zeigt Tabelle 4.

#### Analysen von Menschenharn

100 ml Harn wurden mit Essigsäure auf pH 3,5 gebracht und bis auf etwa 15 ml eingengt, übergspült und auf

20 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Es wurden verschiedene Mengen auf die Säulen gegeben.

Thiaminpyrophosphat ist im Normalharn nicht enthalten, nach Gabe großer Dosen Vitamin B<sub>1</sub> werden in der wäßrigen Phase jedoch Thiaminderivate gefunden, worauf wir in der Diskussion zurückkommen werden.

#### Untersuchung von Apfelsinensaft

Der Saft einer frischen Apfelsine wurde bei 40° Badtemperatur auf 10 ml eingengt, dann zentrifugiert (30 Min. bei 12000 U./Min.) und je 0,2 ml auf 2 Säulen gegeben. Das Ergebnis zeigt Tabelle 6. Enteiweißung war nicht erforderlich.

#### Untersuchung von Weizenauszugsmehl, Type 405 ohne Vitaminzusatz

5 g Mehl wurden in 25 ml dest. Wasser eingerührt, 25 ml 10proz. Trichloressigsäure zur Eiweißfällung zugegeben, zentrifugiert (15 Min. bei 5000 U./Min.), der Überstand abgegossen, mit NaOH auf pH 3,5 gebracht und bei 40° Badtemperatur bis auf 5 ml eingengt, wieder zentrifugiert und je 0,2 ml auf 2 Säulen gegeben. Das Ergebnis zeigt Tabelle 7.

Tab. 3

Thiamin- und Thiaminpyrophosphatgehalt von Hefe. Doppelanalysen an 2 Sephadexsäulen I und II

Präparation am	Analyse am	Thiamin (µg/100 g Hefe)		Thiaminpyrophosphat (µg/100 g Hefe)		Gesamt-Thiamin (µg/100 g Hefe)
		I	II	I	II	
30. 9. 68	1. 10. 68	44,8	44,8	964	953	742
	2. 10. 68	38,7	37,3	954	934	724
	3. 10. 68	35,3	35,3	1010	1013	770
	4. 10. 68	75,0	77,8*	930	935*	752

\* Wahrscheinlich ist ein Teil der Cocarboxylase zu Thiamin abgebaut worden.

Tab. 4

Thiamin- und Thiaminpyrophosphatgehalt von *Lactobacillus viridescens*.

Präparation am	Analyse am	Thiamin (µg/ml Überstand)		Thiaminpyrophosphat (µg/ml Überstand)	
		I	II	I	II
20. 3. 69	24. 3. 69	10,20	10,24	9,58	9,56
	25. 3. 69	9,49	9,67	9,57	9,79
	31. 3. 69	9,85	10,42	9,69	9,97
	1. 4. 69	10,12	10,28	9,97	10,08
	2. 4. 69	10,03	10,03	10,28	10,25

Tab. 5

Thiamingehalt von Menschenharn bei unterschiedlicher Aufnahme von Vitamin-B<sub>1</sub>. Der Harn wurde anschließend an die Periode der Vitamin-B<sub>1</sub>-Einnahme asserviert

Präparation am	Analyse am	Aufgegebene Menge Harn (ml)	Thiamin (mg/l)	Thiaminderivate als Thiaminpyrophosphat (mg/l)	Thiamingabe per os
18. 1. 68	18. 11. 68	0,05	8,0	nicht gemessen	3 Tage tgl. 100 mg und 14 Tage tgl. 2 Kapseln Gerobion*
		0,1	7,6		
		0,05	8,4		
11. 3. 69	11. 3. 69	0,025	7,6	14,2	5 Tage tgl. 300 mg
		0,2	29,4		
		0,2	28,8		
26. 11. 68	27. 11. 68	0,05	0,84	13,4	über läng. Zeit tgl. eine Kapsel Gerobion
		0,1	0,84		
		0,1	0,82		
		0,2	0,83		
		0,3	0,93		
4. 12. 68	4. 12. 68	0,4	0,92	nicht vorhanden	—
		0,2	0,28		
		0,2	0,28		

\*) Eine Kapsel Gerobion enthält nach Angabe des Herstellers 4 mg Cocarboxylase.

Tab. 6

Thiamin- und Thiaminpyrophosphatgehalt von Apfelsinensaft

Analyse am	Thiamin (µg/100 ml)		Thiaminpyrophosphat (µg/100 ml)	
	I	II	I	II
6. 12. 68	61,6	61,7	76,0	66,6
28. 2. 69	61,6	67,3	83,2	79,9

Tab. 7

Thiamin- und Thiaminpyrophosphatgehalt von Weizenmehl Type 405

Analyse am	Thiamin (µg/100 g)		Thiaminpyrophosphat (µg/100 g)	
	I	II	I	II
12. 12. 68	23,3	21,2	—	—

## Diskussion

Die Beispiele ergeben, daß die Methode allseitig zu verwenden ist, sobald mindestens  $0,1\mu\text{g}$  Thiamin bzw. -pyrophosphat in der Probe, die auf die Säule gegeben wird, enthalten ist. Die günstigste Menge liegt zwischen  $0,5$  und  $3\mu\text{g}$ . Es war nicht beabsichtigt, vollständig ausgearbeitete Methoden zur Aufarbeitung der verschiedenen Produkte zu geben. Dagegen wurden in einigen Fällen Zusätze von reinen Substanzen getestet — in allen Fällen wurde die Probe so gewählt, daß die in ihr enthaltene Thiamin- bzw. Thiaminpyrophosphatmenge in etwa den zugesetzten Mengen entsprach (Tab. 8) — und die Ergebnisse dieser Methode mit

Tab. 8

Wiederfindungsrate für zu analysierten Proben zugesetztes Thiamin bzw. Thiaminpyrophosphat

Analyse	Probe	Zusatz <sup>1</sup>		Wiedergefunden	
		Thiamin- ( $\mu\text{g}$ )	Thiaminpyrophosphat ( $\mu\text{g}$ )	Thiamin (%)	Thiaminpyrophosphat (%)
*24./28. 4.	Bäckerhefe	0,4	1,0	92	96
29./30. 4.	Bäckerhefe	0,75	1,0	105	101
6. 5.	Apfelsine	1,67	1,67	96	98
6. 5.	Apfelsine	1,67	1,67	95	99

<sup>1</sup>) Da die Bäckerhefe 10mal soviel Cocarboxylase wie Thiamin enthält, konnten die beiden Zusätze nicht zur gleichen Verdünnung zugegeben werden.

Tab. 9

Vergleich der hier angegebenen Methode mit der papierchromatographischen Bestimmung (7)

Analyse am	Probe	Thiamin ( $\mu\text{g}$ )		Cocarboxylase ( $\mu\text{g}$ )		Bemerkungen
		Säule	Papier	Säule	Papier	
14. 11. 68	reines Thiaminhydrochlorid $1\mu\text{g}$	0,96				} $\bar{x}_n, n = 2$
11. 11. 68			0,95			
13. 11. 68	reine Cocarboxylase mit Phosphatase gespalten	0,59		0,21		$\triangleq 2,22 \text{ nMol}^*)$
11. 11. 68	$1\mu\text{g}$		0,76		0	$\triangleq 2,26 \text{ nMol}$
18. 11. 68	1 ml Harn**)	7,82	7,82	—	—	} $\bar{x}_n, n = 2$
26. 11. 68	1 ml Harn**)	0,84	0,87	—	—	

<sup>\*)</sup> Im Falle der Papierchromatographie wurde die Cocarboxylase quantitativ durch Phosphatase in Thiamin umgewandelt. Bei der Aufarbeitung für die Säulen war die Aufspaltung nicht vollständig. (2 S76) Es wurden deshalb die gefundenen nMol miteinander verglichen.

<sup>\*)</sup> Vgl. Tab. 5.

denen der papierchromatographischen Bestimmung (7) verglichen (Tab. 9).

Wie schon erwähnt, wird im Normalharn kein Thiaminpyrophosphat gefunden. Beim Ausschütteln des Säuleneluats mit Amylalkohol ohne vorhergehende Oxydation von Harn nach Gabe hoher Dosen — die Versuchsperson hatte vor dem Sammeln des Harns 14 Tage lang 2 Kapseln Gerobion und 3 Tage 100 mg Thiamin täglich eingenommen — zeigte sich in der alkoholischen Phase eine leichte Blaufluoreszenz. Sie stammt wahrscheinlich von ausgeschiedenem Thiochrom: bei Ansäuern verschwindet sie und tritt nach Alkalischemachen wieder auf, ein für Thiochrom typisches Verhalten.

Nach Oxydation im Alkalischen war die alkoholische Phase bei Ausschütteln des Säuleneluats mit Amylalkohol stark blau. Die wäßrige Phase fluoreszierte ebenfalls blau.

Um festzustellen, welche Substanzen ausgeschieden werden, wurden die einzelnen Phasen auf Chromatographiepapier getropft. Die einfache amylnalkoholische Ausschüttelung, ohne vorhergehende Oxydation, zeigt keine Fluoreszenz. Die Menge war also trotz Einengens zu gering. Die alkoholische Phase nach Oxydation, zeigte viel Thiamin, aber keine andere Substanz. Die wäßrige Phase des alkoholischen Auszugs nach Oxydation zeigte auf dem Papier zwei Flecke, wahrscheinlich 2 Phosphatester des Thiamins. Die Natur dieser Substratflecke haben wir aber nicht näher untersucht.

Tab. 10

Mittlere quadratische Abweichung bei der Bestimmung verschiedener Mengen von Thiamin bzw. Thiaminpyrophosphat

Thiamin ( $\mu\text{g}$ )	n	s <sup>2</sup> (%)	Thiaminpyrophosphat ( $\mu\text{g}$ )	n	s <sup>2</sup> (%)
0,5	17	1,7	0,5	17	4,1
1,0	17	3,6	1,0	17	7,1
1,5	17	1,6	1,5	17	3,3
2,0	17	2,3	2,0	17	3,2

Als Letztes errechneten wir aus je 17 Analysen die mittlere quadratische Abweichung (Tab. 10), die für Thiamin bei der Berechnung aller  $x_i$ -Werte  $\pm 2,3\%$ , für Thiaminpyrophosphat  $\pm 4,6\%$  ergab. Die zugrunde liegenden Analysen erstreckten sich über einen Zeitraum von einem Monat, enthalten also auch die täglichen Schwankungen der Eichkurven und des Leerwertes. Stellt man aus den einfachen Mittelwerten jeder Reihe von 17 Analysen, die Eichreihen für Thiamin und Thiaminpyrophosphat auf, so ergeben sich lineare Eichkurven: für Thiamin mit dem errechneten Leerwert von  $L = 16,2$  Skalenteilen und dem Eichkurvenfaktor  $F = 0,041$ , für Cocarboxylase  $L = 13,6$  Skalenteile und  $F = 0,048$ . Berechnet man die abgelesenen Durchlässigkeitsprozente der zu bestimmenden Analysenproben mit diesen Leer- und Faktorwerten, so tritt für Thiamin eine mittlere quadratische Abweichung von  $\pm 2,3\%$  und für Cocarboxylase von  $\pm 6,2\%$ , aus 52 Werten ermittelt, auf. Es ist also eine schnelle Orien-

tierung möglich, wenn man etwas geringere Anforderungen an die Genauigkeit der Analysenergebnisse stellt.

Der große Vorteil der Methode liegt darin, daß sie wenig Zeit und Aufwand erfordert, daß man auf die Aufspaltung von Thiaminpyrophosphat zu Thiamin und auf möglichst vollständige Enteiweißung verzichten

kann, und daß die Regeneration der Säulen, die sehr viel Zeit beansprucht, entfällt. Es muß allerdings bemerkt werden, daß man, wie bei den einfachen Analysen mit Aufspaltung von Thiaminpyrophosphat zu Thiamin, in der wäßrigen Phase alle Phosphatester zusammen erfaßt.

Ich danke Fräulein SCHLIEKER für ihre zuverlässige Mitarbeit.

### Literatur

1. JANSEN, B. C. P., *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* 55, 1046 (1936)  
2. GSTIRNER, F., *Chem.-phys. Vit.-Best. Meth.*, Seite 68—111, Enke-Verlag Stuttgart (1965). — 3. KARRER, P., *Helv. chim. Acta* 20, 1147 (1937). — 4. FLAVIER, H. und L. GENEVOIS, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 130, 497 (1939). — 5. WESTENBRINK, H. und J. GOUDSMIT, *Ned. tschr. geneesk.* 81, 2632 (1937). — 6. RITSERT, K., *Klin. Wschr.* 17 (1938). — 7. KRAUT, H. und

L. WILDEMAN, *Internat. Zschr. Vitaminforsch. Bern* 27, 122 (1956); KAISER, H. und L. WILDEMAN, ebenda 27, 131 (1956).  
8. KNOBLOCH, E., *Phys.-Chem. Vit.-Best. Meth.*, Seite 174, Akademie-Verlag Berlin (1963). — 9. ROTH, H., *Biochem. Z.* 297, 52 (1938). — 10. WESTENBRINK, H. G. K. und E. P. STEYN-PARVÉ, *Internat. Zschr. Vitaminforsch. Bern* 27, 461 (1950). — 11. OSTROVSKIJ, Yu. M., *Bjull. eksper. biol. med. Moskva* 42, 72 (1956).

Dr. Liesel Wildemann

Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie  
4600 Dortmund, Rheinlanddamm 201